

Активация термогенных футильных циклов в адипоцитах при гиперэкспрессии креатинкиназы В и глицеролкиназы

Мичурина С.^{1*}, Стафеев Ю.¹, Белоглазова И.¹, Гольцева Ю.^{1,2}, Дергилев К.¹, Парфёнова Е.^{1,2}

¹ *Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова МЗ РФ, Москва, Россия*

² *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

* *michurinas192@gmail.ru*

Ключевые слова: термогенез; креатинкиназа В; глицеролкиназа; адипоциты

Мотивация и цель: Термогенез в жировой ткани представляет собой процесс диссипации избыточной энергии окисления глюкозы, жирных кислот и других субстратов в виде тепла. Благодаря анорексигенному и гипогликемическому эффекту термогенез является перспективной мишенью для разработки новых терапевтических подходов для борьбы с ожирением, сахарным диабетом 2 типа и сопутствующими метаболическими заболеваниями. Наряду с каноническим механизмом термогенеза, осуществляемым белком разобщителем внутренней мембраны митохондрий UCP1, продукция тепла в адипоцитах может увеличиваться при повышении активности футильных циклов [1–3]. Мы предположили, что активация термогенных футильных циклов, включающих креатинкиназный и триацилглицеридный циклы, может способствовать изменению углеводного и липидного метаболизма жировых клеток, усиливать утилизацию глюкозы и триглицеридов в окислительных процессах. Цель представленной работы заключается в активации экспрессии ключевых ферментов футильных циклов (креатинкиназы В (СКВ) и глицеролкиназы (ГК)) в адипоцитах и анализе метаболизма модифицированных клеток [1, 4].

Методы и алгоритмы: Исследование проводили на культуре клеток 3T3-L1, дифференцированных в адипоциты под действием инсулина, изобутилметилксантина, дексаметазона и розиглитазона. Для получения лентивирусных конструкций для активации ГК и СКВ белок-кодирующие последовательности мРНК NM_008194.3, NM_021273.4 были амплифицированы с помощью ПЦР с обратной транскрипцией и клонированы в вектор Lego-iG2, на основе которого были получены лентивирусные частицы. Зрелые адипоциты трансдуцировали и через 48 ч оценивали регуляцию экспрессии целевых белков методами ПЦР в реальном времени и иммуноблоттинга. В модифицированных клетках исследовали активность поглощения глюкозы, липолиза и липогенеза методом радиоизотопного анализа с применением [³H]-2-дезоксиглюкозы и [¹⁴C]-глюкозы. Метаболические параметры клеток оценивали в базальном состоянии и при стимуляции важнейшими регуляторами метаболизма адипоцитов: инсулином и норадреналином. Влияние гиперэкспрессии СКВ и ГК на термогенез, мембранный потенциал митохондрий и накопление липидов оценивали методом конфокальной микроскопии при визуализации клеток с помощью флуоресцентных зондов ERthermAC, JC-1 и BODIPY493/503. Обработку

микрофотографий и количественный анализ проводили в программе Image ExFluorger с использованием машинного обучения.

Результаты: Полученные генетические конструкции увеличивают экспрессию СКВ и ГК в зрелых адипоцитах. Показано, что в клетках с гиперэкспрессией СКВ и ГК усиливается поглощение глюкозы в ответ на норадреналин, но не происходит изменение активности липолиза, липогенеза и инсулиновой чувствительности. Было продемонстрировано, что повышение экспрессии белков СКВ и ГК в адипоцитах ассоциировано с уменьшением количества мелких и средних липидных капель за счет увеличения экспрессии активатора слияния капель – белка FSP27. Гиперэкспрессия СКВ и ГК не оказывала влияние на базальный уровень термогенеза, но усиливала продукцию тепла при стимуляции норадреналином в сравнении с контрольными клетками. Кроме того, при активации экспрессии СКВ и ГК было обнаружено увеличение количества митохондрий с высоким мембранным потенциалом.

Выводы: При активации экспрессии СКВ и ГК, которые являются ключевыми ферментами креатинкиназного и триацилглицеридного футильных циклов, происходит повышение чувствительности клеток к норадреналину. В ответ на стимуляцию адренорецепторов в адипоцитах с повышенной экспрессией СКВ и ГК происходит более сильная активация термогенеза и поглощения глюкозы, чем в контрольных клетках. Повышение мембранного потенциала митохондрий в модифицированных клетках может быть связано с необходимостью в увеличении синтеза АТФ, так как активность футильных циклов сопряжена с расходом энергии. Таким образом, активация экспрессии СКВ и ГК может быть использована для получения термогенных адипоцитов, характеризующихся высоким уровнем поглощения и утилизации глюкозы. На основе полученных клеток возможна разработка новых подходов в генной и клеточной терапии ожирения и сопутствующих метаболических заболеваний.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 22-75-10085.

Overexpression of creatine kinase B and glycerol kinase activates thermogenic futile cycles in adipocytes

Michurina S.^{1*}, Stafeev I.¹, Beloglazova I.¹, Goltseva Y.^{1,2}, Dergilev K.¹, Parfyonova Ye.^{1,2}

¹ National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

* michurinas192@gmail.ru

Key words: thermogenesis; creatine kinase B; glycerol kinase; adipocytes

Motivation and Aim: Thermogenesis in adipose tissue dissipates excessive energy of glucose and fatty acids oxidation in the form of heat. Due to its anorexigenic and hypoglycemic effects, thermogenesis is a promising target for the development of new therapeutic approaches to combat obesity, type 2 diabetes mellitus and concomitant metabolic diseases. Along with the canonical mechanism of thermogenesis carried out by the uncoupling protein of mitochondrial inner membrane UCP1, heat production in adipocytes can be increased during futile cycles [1–3]. We suggest that activation of

thermogenic futile cycles, including creatine kinase and triacylglyceride cycles, may contribute to changes in carbohydrate and lipid metabolism of fat cells, enhance the utilization of glucose and triglycerides in oxidative processes. The purpose of the presented work is to activate the expression of key enzymes of the futile cycles (creatine kinase B (CKB) and glycerol kinase (Gyk)) in adipocytes and analyze the metabolism of modified cells [1, 4].

Methods and Algorithms: The study was performed in 3T3-L1 cells differentiated into adipocytes using insulin, isobutylmethylxanthine, dexamethasone and rosiglitazone. To obtain lentiviral constructs for Gyk and CKB overexpression, the protein-coding mRNA sequences NM_008194.3, NM_021273.4 were cloned into the Lego-iG2 vector using RT PCR. Mature adipocytes were transduced, and the expression of target proteins was measured in 48h by real-time PCR and immunoblotting. In modified cells glucose uptake, lipolysis and lipogenesis were analyzed using [³H]-2-deoxyglucose and [¹⁴C]-glucose. Metabolic parameters were measured in the basal state and under stimulation with important regulators of adipocyte metabolism: insulin and norepinephrine. Thermogenesis, mitochondrial membrane potential and lipid accumulation were examined by confocal microscopy of cells stained with ERthermAC, JC-1 and BODIPY493/503. Processing of microphotographs and quantification were carried out in Image ExFluor using machine learning.

Results: The obtained genetic constructs increase the expression of CKB and Gyk in mature adipocytes. Adipocytes overexpressing CKB and Gyk has demonstrated enhanced glucose uptake in response to norepinephrine. However, they CKB and Gyk had no effect on lipolysis, lipogenesis and insulin sensitivity. Increased expression of CKB and Gyk in adipocytes was associated with a decrease in the number of small and medium sized lipid droplets due to increased expression of the droplet fusion activator FSP27. Overexpression of CKB and Gyk had no effect on the basal level of thermogenesis, but expression of both proteins increased heat production in response to norepinephrine. In addition, activation of CKB and Gyk expression increased the number of high membrane potential mitochondria in adipocytes.

Conclusion: Activation of CKB and Gyk, which are the key enzymes of the creatine kinase and triacylglyceride futile cycles, increases adipocytes norepinephrine sensitivity. Adipocytes overexpressing CKB and Gyk have higher level of thermogenesis and glucose uptake activation in response to adrenergic stimulation. An increase in the mitochondrial membrane potential in genetically modified cells could be associated with the increased ATP synthesis, since the activity of futile cycles is associated with elevated energy demand. Thus, activation of CKB and Gyk can be used to develop thermogenic adipocytes with high level of glucose consumption and utilization. Transplantation of obtained thermogenic adipocytes can become a new approach in gene and cell therapy of obesity and related metabolic disorders.

Funding: The study is supported by RSF grant No. 22-75-10085.

Список литературы/References

1. Kazak L. Promoting metabolic inefficiency for metabolic disease. *iScience*. 2023;26(10):107843. doi 10.1016/j.isci.2023.107843
2. Chouchani E.T., Kazak L., Spiegelman B.M. New advances in adaptive thermogenesis: UCP1 and beyond. *Cell Metabolism*. 2019;29(1):27-37
3. Bardova K., Funda J. et al. Additive effects of omega-3 fatty acids and thiazolidinediones in mice fed a high-fat diet: triacylglycerol/fatty acid cycling in adipose tissue. *Nutrients*. 2020;12(12):3737
4. Leroyer S.N. et al. Rosiglitazone controls fatty acid cycling in human adipose tissue by means of glyceroneogenesis and glycerol phosphorylation. *J Biol Chem*. 2006;281(19):13141